

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



REGENERAÇÃO PERIODONTAL COM CÉLULAS ESTAMINAIS

Ana Catarina Carvalho César

MESTRADO INTEGRADO
em
Medicina Dentária

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



REGENERAÇÃO PERIODONTAL COM CÉLULAS ESTAMINAIS

Ana Catarina Carvalho César

Dissertação orientada pela Sr^a Dr^a Susana Noronha

MESTRADO INTEGRADO
em
Medicina Dentária

2011

Agradecimentos

À Sr^a Dr^a Susana Noronha, pela disponibilidade e incansável apoio na orientação da presente dissertação.

À mulher da minha vida, a minha Mãe, pelo amor, carinho, dedicação e apoio ao longo destes anos.

Aos homens da minha vida. Ao meu Pai, pelo amor, pelos valores em mim inculcados e pelo exemplo de vida em que se tornou. Ao Pedro, pelo amor, paciência e apoio intermináveis ao longo destes últimos meses da minha vida académica.

Aos meus avós, por serem acima de tudo uns segundos pais.

Aos meus amigos em geral, e à Raquel e a Eva em particular, por serem as melhores amigas sempre e para sempre.

À minha dupla, Joana Fróis, por toda a paciência e compreensão, risos e choros ao longo destes anos, foste sem dúvida mais do que uma mãe.

À Mafalda Barros, por estar sempre presente, mesmo nos piores momentos.

A todos os outros colegas, que apesar de alguns altos e baixos, fizeram destes 6 anos os melhores anos da minha vida.

A todos os Profs., Drs. e assistentes dentárias, por tudo o que me ensinaram.

A todos vós, dedico esta dissertação. Um muito obrigada!

“Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas,
O resto é sombra de árvores alheias”

Fernando Pessoa

Resumo

O periodonto é um órgão de topografia complexa constituído por tecido epitelial e tecidos de conexão moles e mineralizados. Várias doenças afectam a composição e a integridade das estruturas periodontais, causando destruição da matriz do tecido conjuntivo e das células, com perda de inserção fibrosa e reabsorção do osso alveolar.

O objectivo principal do tratamento periodontal é evitar a progressão da perda de inserção e alcançar a regeneração dos tecidos periodontais perdidos. A fim de alcançar a regeneração periodontal com sucesso, novo cemento acelular unido à superfície dentinária subjacente, novo ligamento periodontal com fibras de colagénio funcionalmente orientadas e inseridas em novo cemento e novo osso alveolar unido ao ligamento periodontal são obrigatórios.

Até à data, diversas terapias e técnicas, tais como colocação de autoenxertos, aloenxertos e materiais aloplásticos, técnicas de regeneração tecidual guiada, utilização de proteínas derivadas da matriz de esmalte, plasma rico em plaquetas e a associação dessas abordagens têm sido utilizadas na prática clínica. No entanto, os resultados clínicos obtidos com estes métodos variam e são muitas vezes imprevisíveis.

Actualmente, a compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na formação e regeneração dos tecidos periodontais, e as abordagens com base na engenharia de tecidos surgiram como alternativas potenciais para o tratamento convencional.

A utilização de células adequadas transplantadas em defeitos ósseos periodontais parece ser uma estratégia poderosa para promover a regeneração do tecido periodontal. As células estaminais mesenquimais (MSCs) isoladas da medula óssea têm o potencial de diferenciação, o que poderia ser uma nova opção para a regeneração do tecido periodontal.

Palavras-Chave: Doença Periodontal, Regeneração Periodontal, Cicatrização Periodontal, Engenharia Tissular, Células estaminais.

Abstract

The periodontium is a topographically complex organ consisting of epithelial tissue and soft and mineralized connected tissues. Several diseases affect the composition and integrity of periodontal structures causing destruction of the connective tissue matrix and cells, loss of fibrous attachment and resorption of alveolar bone.

The major goal of periodontal treatment is to prevent the progression of attachment loss and to achieve the regeneration of the periodontal supporting tissues lost. In order to achieve successful periodontal regeneration, the formation of a functional epithelial seal, new connective tissue fibers inserted into the root, new acellular cementum reformed on the root surface and alveolar bone height restored are required.

To date, several therapies or techniques, such as placement of autografts, allografts and alloplastic materials, guided tissue regeneration technique, use of enamel matrix derivative, platelet-rich plasma and association of these approaches have been used in clinical practice. However, the clinical results obtained with these methods vary widely and are often unpredictable.

Currently, a great improvement has been made on the understanding of cellular and molecular events involved in the formation and regeneration of periodontal tissues, and tissue engineering based approaches have emerged as prospective alternatives to conventional treatment.

The use of suitable cells transplanted into periodontal osseous defects appears to be a powerful strategy to promote periodontal tissue regeneration. Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow have the potencial for multilineage differentiation, what could be a novel option for periodontal tissue regeneration.

Key Words: Periodontal Disease, Periodontal Regeneration, Periodontal wound healing, Tissue Engineering, Stem Cells.

Índice

• Introdução.....	1
○ Os Tecidos Periodontais e a sua origem embrionária.....	3
○ A Doença Periodontal.....	4
○ Etiopatogénese da doença periodontal.....	5
○ Características histológicas dos tecidos na Doença Periodontal.....	5
○ Diagnóstico da Doença Periodontal.....	7
○ Classificação da Doença Periodontal.....	10
○ Tratamento Periodontal.....	10
• Regeneração Periodontal.....	11
• Cicatrização Periodontal	12
• Osteogénese, Osteocondução e Osteoindução	14
• Definição de Engenharia Tissular	14
• Técnicas de Regeneração Actuais.....	16
○ Enxertos ósseos.....	16
○ RTG.....	18
○ Proteínas Derivadas da Matriz de Esmalte.....	19
○ Plasma Rico em Plaquetas.....	20
• Novas Abordagens Terapêuticas.....	21
○ Células estaminais.....	21
▪ Células estaminais derivadas de dentes decíduos esfoliados.....	25
▪ Células estaminais da polpa dentária.....	26
▪ Células estaminais do folículo dentário.....	27
▪ Células estaminais do ligamento periodontal.....	28
• Conclusão.....	30

Introdução

O periodonto é uma estrutura dinâmica constituída por tecidos que apoiam e envolvem o dente. Esses tecidos incluem a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar (Lindhe et al., 2008)

A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. O periodonto, também chamado de “aparelho de inserção” ou “tecido de suporte dos dentes”, forma uma unidade de desenvolvimento biológica e funcional, que está sujeita a determinadas alterações morfológicas relacionadas quer com modificações funcionais bem como com modificações no próprio meio oral (Lindhe et al., 2008).

Várias doenças afectam a constituição e a integridade das estruturas periodontais, causando destruição da matriz do tecido conjuntivo e células, perda de inserção fibrosa e reabsorção do osso alveolar, o que pode levar a maioria das vezes à perda das estruturas dentárias.

O conhecimento da arquitectura e da biologia do tecido periodontal saudável é um pré-requisito para a compreensão e diagnóstico do tecido periodontal patologicamente alterado. Alterações das características normais são considerações necessárias ao diagnóstico e, o conhecimento do estado de saúde é essencial para a definição das metas de tratamento.

O Tratamento periodontal tem por objectivo a eliminação do factor etiológico com o intuito de travar a progressão da perda de inserção periodontal, regenerar os tecidos de suporte perdidos e evitar recidivas.

As terapias convencionais, como a destartarização e o alisamento radicular, são métodos eficazes para tratar e prevenir a progressão da periodontite na maioria dos casos. No entanto, apesar destes tratamentos convencionais poderem eliminar o factor etiológico, não são capazes de regenerar tecidos perdidos, como o osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (Nakahara, 2006).

A regeneração periodontal requer novo tecido conjuntivo que faça a união do osso à superfície radicular. É um processo que envolve a formação de novo cimento em superfícies radiculares tratadas, a síntese de fibras de Sharpey e a sua nova inserção conjuntiva no novo cimento formado (Yang et al., 2009).

Uma série de estudos têm demonstrado o sucesso da regeneração dos tecidos

periodontais utilizando terapias convencionais de regeneração periodontal, tais como enxertos ósseos, regeneração tecidual guiada (RTG), proteínas derivadas da matriz do esmalte, plasma rico em plaquetas e combinações destas terapias (Simsek et al., 2010).

Apesar das diferentes técnicas de regeneração referidas apresentarem bons resultados, estes revelam-se bastante variáveis e imprevisíveis, havendo a necessidade de investir em novas técnicas que levem à regeneração do periodonto.

Em busca de novas terapias de regeneração do periodonto, têm sido propostas técnicas de engenharia tissular, baseadas na biologia das células estaminais. As células estaminais são células indiferenciadas que apresentam a capacidade de se auto-renovar e originar múltiplas linhas celulares. Dependendo dos sinais estimuladores que recebem, as células estaminais podem diferenciar-se em qualquer tipo de célula especializada como condrócitos, tenócitos, adipócitos, células musculares e células nervosas *in vitro* e *in vivo*, bem como em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos periodontais (Simsek et al. 2010). Esta capacidade de diferenciação, tem sido investigada para a regeneração dos tecidos periodontais.

Pretende-se com a presente monografia realizar uma revisão da literatura científica relacionada com esta recente modalidade de tratamento periodontal regenerativo baseada nos conceitos da engenharia de tissular.

Materiais e métodos: Foi realizada uma revisão bibliográfica em sítios da internet, nomeadamente na B-on, Pubmed e Medline, tendo sido usadas como palavras-chave: Periodontal Disease, Periodontal Regeneration, Periodontal wound healing, Tissue Engineering, Stem Cells.

Tecidos periodontais e a sua origem embrionária

O periodonto é constituído por estruturas que podem ser divididas em duas partes: a primeira constituída pelo cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar e a segunda, pela gengiva. As primeiras estruturas são responsáveis pela ancoragem do dente ao alvéolo, formando o que designamos de periodonto de inserção ou de sustentação. A gengiva, por sua vez recobre a crista do processo alveolar e estabelece a continuidade do epitélio da mucosa oral com o colo do dente através do epitélio juncional, sendo chamada, por isso, periodonto marginal ou de protecção (Oda e Carvalho, 2004).

O desenvolvimento dos tecidos periodontais ocorre durante o crescimento e a formação dos dentes. Este processo começa no início da fase embrionária, quando as células da crista neural migram para o primeiro arco branquial. Nesta posição as células da crista neural formam uma faixa de ectomesênquima abaixo do epitélio estomodeo (cavidade oral primitiva). Após as células da crista neural terem atingido a sua localização no espaço correspondente à boca, o epitélio do ostomodeo liberta factores que iniciam interacções entre o epitélio e o ectomesênquima. Uma vez que estas interacções tenham ocorrido, o ectomesênquima assume um papel dominante no decorrer do desenvolvimento (Lindhe et al., 2008).

Após a formação da lâmina dentária, inicia-se uma série de processos (estágio de botão, estágio de capuz, estágio de campânula e o desenvolvimento da raiz) que resultam na formação de um dente e dos seus tecidos periodontais, incluindo o osso alveolar propriamente dito. Durante o estágio de capuz, células ectomesênquimais condensam-se em relação ao epitélio oral, formando a papila dentária, que dá origem à dentina e à polpa, e o folículo dentário, que origina os tecidos periodontais de suporte (cemento, ligamento periodontal e osso alveolar propriamente dito) (Lindhe et al., 2008).

O desenvolvimento da raiz e dos tecidos periodontais segue-se ao da coroa. As células epiteliais internas e externas (órgão dentário) proliferam na direcção apical, formando uma camada dupla de células denominada bainha radicular epitelial de Hertwig. Os odontoblastos que formam a dentina radicular diferenciam-se a partir de células ectomesênquimais da papila dentária sob a influência indutiva das células epiteliais internas. A dentina continua a formar-se em direcção apical, produzindo a estrutura da raiz. O cemento acelular, assim como os tecidos periodontais, desenvolvem-se durante a formação da raiz. Alguns dos eventos na cementogénese

ainda não estão muito claros. O conceito que segue, entretanto, está a surgir gradualmente. Quando a formação da dentina radicular começa, as células internas da bainha radicular epitelial de Hertwig sintetizam e libertam proteínas relacionadas com o esmalte, provavelmente pertencentes à família das amelogeninas. No final deste período, a bainha epitelial torna-se fenestrada e através destas fenestrações as células ectomesênquimais do folículo dentário penetram, entrando em contacto com a superfície da raiz. As células ectomesênquimais em contacto com as proteínas relacionadas com o esmalte diferenciam-se em cementoblastos e começam a formar o tecido cementóide. Este tecido representa a matriz orgânica do cimento e consiste em substância fundamental e fibras colagénicas, que se unem às fibras colagénicas que ainda não estão completamente mineralizadas na camada mais externa da dentina. Supõe-se que o cimento se torne firmemente aderido à dentina por meio da interacção destas fibras. A formação do cimento celular, que cobre o terço apical da raiz dentária, difere da formação do cimento acelular, pois alguns cementoblastos são aprisionados no cimento (Lindhe et al., 2008).

As outras estruturas do periodonto são formadas pelas células ectomesênquimais do folículo dentário lateral ao cimento. Algumas delas diferenciam-se em fibroblastos periodontais e formam as fibras do ligamento periodontal, enquanto que outras se diferenciam em osteoblastos, produzindo o osso alveolar propriamente dito, no qual as fibras periodontais estão ancoradas. Embora sem comprovação documentada, acredita-se que as células ectomesênquimais permanecem no periodonto adulto, tomando parte no processo de renovação local do tecido (Lindhe et al., 2008).

Doença Periodontal

A periodontite é uma das patologias que pode afectar os tecidos periodontais. Trata-se de uma doença infecciosa, multifactorial, com etiologia nas bactérias da placa bacteriana que são capazes de desencadear uma resposta inflamatória nos tecidos periodontais em indivíduos susceptíveis (Nakahara, 2006).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre o hospedeiro e as referidas bactérias, porém, quando alguns factores de risco, como o tabaco, diabetes não controlada, higiene oral deficiente, hereditariedade, entre outros, alteram esta estabilidade, o processo inflamatório agrava-se podendo levar à perda dos tecidos periodontais, manifestando-se clinicamente pela presença de bolsas, hemorragia

gingival, recessão gengival, mobilidade dentária, entre outros (Nakahara, 2006).

A doença periodontal é a principal causa de perda de dentes e representa um problema de saúde pública a nível mundial (Zhao et al., 2008). A reconstrução do periodonto saudável destruído pela doença periodontal é um dos principais objectivos da terapia periodontal (Seo et al., 2004).

Etiopatogénese da doença periodontal

O factor etiológico principal da doença periodontal é a placa bacteriana (Radvar et al., 2009) que é constituída por biofilmes polimicrobianos altamente organizados que causam doença quando deixada acumular. Desta forma, a doença periodontal vai desenvolver-se quando ocorre uma quebra no equilíbrio existente entre os microrganismos e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Armitage et al., 2009; Lindhe et al., 2008).

Offenbacher em 1996 propôs um modelo que pretendia explicar os mecanismos da patogénese da periodontite, no qual incluiu quer o factor etiológico bacteriano quer os mecanismos de defesa do hospedeiro. Neste modelo Offenbacher estipulou que num paciente com flora normal saudável que não adquire organismos patogénicos, a doença periodontal não se desenvolve. Por outro lado, se um paciente apresenta baixa higiene oral a placa bacteriana vai acumular-se e irá desenvolver-se gengivite, no entanto poderá não ser suficiente para que ocorra o aparecimento de periodontite (Offenbacher, 1996).

Características histológicas dos tecidos na doença periodontal

Em 1976, Page e Schroeder dividiram a lesão progressiva dos tecidos gengivais/periodontais em 4 fases: inicial, precoce, estabelecida e avançada. Esta última era considerada como a fase que reflectia a progressão da gengivite para a periodontite (Page e Schroeder, 1976).

Lesão inicial

Assim que a placa bacteriana se encontra no terço cervical da coroa dentária, inicia-se um processo inflamatório. Passadas 24 horas já são evidentes alterações no plexo dentogengival, ocorrendo dilatação das arteríolas, capilares e vénulas, o que

resulta num aumento do aporte sanguíneo para a área inflamada. Dá-se início então à migração de células polimorfonucleares (PMN) e, em 2-4 dias a resposta celular é mantida por substâncias quimiotáticas originárias da placa bacteriana assim como de células e secreções do hospedeiro.

Lesão precoce

Após alguns dias de acumulação de placa bacteriana, os vasos do plexo dentogengivais permanecem dilatados, verificando-se ainda o aumento do seu número, o que reflecte um aumento da coloração avermelhada da gengiva marginal. Os linfócitos e os PMN continuam a ser as células predominantes no infiltrado inflamatório, ocorrendo a quebra de fibras de colagénio. As células basais dos epitélios sulcular e juncional proliferam, tentando criar uma barreira à placa bacteriana e aos seus produtos. Ocorrem alterações durante esta fase que envolvem a perda da porção coronal do epitélio juncional, permitindo a formação de um nicho entre o epitélio e a superfície dentária. Esta fase pode permanecer por vários dias e a sua progressão para a fase estabelecida reflecte a variabilidade de susceptibilidade entre os sujeitos.

Lesão estabelecida

Com a permanente exposição à placa bacteriana dá-se um aumento na resposta inflamatória, verificando-se um aumento da constituição em células plasmáticas, que constituem 10% a 30% do infiltrado. Ocorre migração do tecido conjuntivo e epitélio juncional, sendo que as células dominantes do infiltrado inflamatório nesta fase são os linfócitos. A perda de colagénio continua à medida que o infiltrado inflamatório se expande e o epitélio juncional é substituído por um epitélio de bolsa periodontal, o qual não está aderido à superfície radicular. Isto permite a migração apical do biofilme, pois este epitélio é mais permeável à passagem de substâncias para o tecido conjuntivo. Existem dois tipos de lesão estabelecida: uma pode permanecer durante meses ou anos, não progredindo; a outra torna-se mais activa e converte-se mais rapidamente para uma lesão avançada, progressiva e destrutiva.

Lesão avançada

Assim que a bolsa periodontal se torna mais profunda, o biofilme continua a sua migração apical e desenvolve-se num ambiente anaeróbio. O infiltrado inflamatório

estende-se igualmente para apical, para o tecido conjuntivo, ocorrendo destruição deste e do osso alveolar. O que distingue esta fase da lesão estabelecida é o facto das células maioritárias passarem a ser células plasmáticas, constituindo mais de 50% do infiltrado inflamatório.

Diagnóstico da doença periodontal

Para formular um plano de tratamento adequado, as várias lesões periodontais devem ser diagnosticadas e o envolvimento delas nas várias partes da dentição identificado. Para tal devemos conhecer as características consideradas normais do periodonto de forma a conseguirmos identificar as características patológicas do mesmo.

Avaliação Clínica

Um diagnóstico preciso só pode ser feito através de uma avaliação meticulosa dos dados que foram recolhidos sistematicamente durante a entrevista ao paciente, a consulta médica e o exame clínico periodontal (Pihlstrom, 2000).

Os sinais clínicos da inflamação gengival incluem mudanças na coloração e na textura do tecido mole marginal bem como o aumento da tendência da hemorragia à sondagem. Vários sistemas de índices têm sido desenvolvidos, em pesquisas clínicas e epidemiológicas, para descrever a gengivite. Apesar do correcto diagnóstico da lesão só poder ser feito por meio de um corte histológico, o sintoma de hemorragia à sondagem na base do sulco gengival/bolsa periodontal está relacionado com a presença de um infiltrado de células inflamatórias nesta área, pelo que a ocorrência desta hemorragia é um indicador importante de doença (Pihlstrom, 2000).

Assim sendo vários parâmetros devem ser avaliados para um correcto diagnóstico de doença periodontal:

- **Hemorragia à sondagem:**

Se a instrumentação provocar hemorragia, o local examinado é considerado inflamado. Este método de registo serve não só para documentar a média de áreas com saúde e com doença na dentição, mas também para identificar os locais que se tornaram saudáveis ou permaneceram doentes (Pihlstrom, 2000).

- **Profundidade de sondagem (PS):**

Define-se como sendo a distância entre a margem gengival e o fundo da bolsa periodontal, medida através de uma sonda graduada. $PS \geq 4$ mm é um indicador de doença periodontal activa (Pihlstrom, 2000).

- **Avaliação do nível de inserção:**

Trata-se da distância em milímetros que vai desde a junção amelocementária até ao fundo da bolsa ou sulco gengival (Lindhe et al., 2008).

Ligeira: <3 mm de perda de inserção clínica;

Moderada: 3-4 mm de perda de inserção clínica;

Severa: ≥ 5 mm de perda de inserção clínica;

- **Avaliação do envolvimento de furca:**

É importante documentar o envolvimento de furca, uma vez que dentes com bolsas periodontais e envolvimento de furca estão directamente associados a um aumento da perda de inserção e a um pior prognóstico após a terapia periodontal, comparativamente a dentes sem envolvimento de furca. A extensão das bolsas em furcas é registada usando uma classificação como a que está abaixo (Lindhe et al., 2008; Pihlstrom, 2000):

Grau 1: Perda horizontal dos tecidos de suporte não excedendo um terço da largura do dente;

Grau 2: Perda horizontal dos tecidos de suporte excedendo um terço da largura do dente, mas não envolvendo toda a largura da área de furca;

Grau3: Destruição horizontal “lado a lado” dos tecidos de suporte na área da furca.

- **Avaliação da mobilidade dentária:**

A perda contínua dos tecidos de suporte na doença periodontal pode resultar num aumento da mobilidade dentária. A mobilidade dentária deve também ser registada tendo em conta que dentes com mobilidade têm um pior prognóstico e maior perda de inserção após a terapia periodontal. O aumento da mobilidade dentária pode ser classificado da seguinte forma (Lindhe et al., 2008; Pihlstrom, 2000):

Grau I Mobilidade da coroa dentária de 0,2-1 mm no sentido horizontal;

Grau II: Mobilidade da coroa do dente superior a 1 mm no sentido horizontal;

Grau III: Mobilidade da coroa dentária nos sentidos vertical e horizontal.

- **Recessão gengival**

Também é registada durante sondagem periodontal como a distância que vai da margem gengival livre até a junção amelo-cementária. Segue-se uma classificação clinicamente útil e amplamente aceite (Pihlstrom, 2000):

Classe I: recessão que não se estende até a junção mucogengival e não está associada com perda de tecido ósseo ou gengival na área interdentária;

Classe II: recessão que se estende até a junção mucogengival não estando associada a perda de massa óssea ou dos tecidos moles na área interdentária;

Classe III: recessão que se estende até ou para além da junção mucogengival, com perda de massa óssea ou dos tecidos moles na área interdentária;

Classe IV: recessão estende-se para além da junção mucogengival com perda severa do osso interdentário e/ou tecidos moles e/ou mau posicionamento severo dos dentes.

Avaliação radiográfica

As radiografias são usadas para confirmar e ampliar os resultados do exame clínico, sendo por isso essenciais. A presença de gengivite, bolsas periodontais e inflamação gengival não pode ser determinado por meio de radiografias, mas as radiografias são fundamentais para a determinação da extensão e gravidade do suporte periodontal e ósseo, bem como para a detecção de lesões ósseas. Quando o exame clínico indica a presença de periodontite, radiografias periapicais e interproximais devem ser obtidas (Pihlstrom, 2000).

Contudo, a análise das radiografias deverá ser feita em conjunto com uma avaliação detalhada da profundidade de sondagem e do nível de inserção, de forma a contemplar uma avaliação correcta das perdas ósseas horizontal e vertical (Lindhe et al., 2008).

Avaliação dos factores de risco

A prevenção e tratamento da doença periodontal baseiam-se no diagnóstico correcto, na redução ou eliminação de agentes causadores, na gestão dos riscos e na correcção dos efeitos nocivos da doença (Pihlstrom, 2000).

A avaliação do risco periodontal pode ser feita com base em factores de risco, indicadores de risco ou preditores de risco. Um factor de risco pensa-se ser a causa de uma doença. Como tal, deve satisfazer dois critérios: ser biologicamente plausível como

agente causal da doença e preceder o desenvolvimento da doença, tendo sido comprovado em estudos clínicos prospectivos. Um indicador de risco é um factor que é biologicamente plausível como agente causador da doença, mas só foi demonstrado associado com a doença em estudos transversais. Alguns indicadores de risco podem ser considerados como factores de risco se os estudos prospectivos forem capazes de confirmar que estes precedem o desenvolvimento da doença. Preditor de risco é um factor que não tem plausibilidade biológica actual como agente causador, mas que tem sido associado à doença de forma transversal ou longitudinal (Pihlstrom, 2000).

Assim sendo, como factores de risco confirmados da doença periodontal temos as influências genéticas, o tabaco e a diabetes não controlada. Várias espécies de bactérias periodontais, o herpesvírus, o aumento da idade, o sexo masculino, a depressão, a raça, a oclusão traumática e a osteoporose feminina na presença de níveis elevados de cálculo dentário foram associados a perda de suporte periodontal segundo estudos transversais e podem ser considerados indicadores de risco da periodontite (Pihlstrom, 2000).

Classificação da doença periodontal

Para uma melhor e mais correcta compreensão da doença periodontal torna-se necessária uma classificação sistemática da mesma. A classificação adaptada pela Academia Americana de Periodontologia é:

- Doenças gengivais
- Periodontite crónica
- Periodontite agressiva
- Periodontite como manifestação de doenças sistémicas
- Doenças periodontais necrosantes
- Abscessos periodontais
- Periodontites associadas a lesões endodónticas
- Deformidades e condições desenvolvidas ou adquiridas

Tratamento Periodontal

Os pré-requisitos para um adequado planeamento do tratamento não serão atingidos até que um diagnóstico detalhado de todas as condições patológicas tenha sido

estabelecido (Lindhe et al., 2008).

O objectivo do tratamento periodontal passa por parar a progressão da doença, bem como pela reversão da perda de inserção resultante da mesma. Para este fim, o tratamento inicial é focado na remoção da placa bacteriana dos dentes e das bolsas periodontais e na prevenção da acumulação de placa supragengival. O controlo de placa supragengival por parte do paciente é um pré-requisito para o sucesso do tratamento periodontal (Wang e Cooke, 2005). A placa subgengival pode ser removida por métodos de tratamento não cirúrgicos, tais como o alisamento radicular, bem como por métodos cirúrgicos (Wang e Cooke, 2005; Yilmaz et al., 2003).

A remoção mecânica do cálculo subgengival e da placa bacteriana pode não ser suficiente para controlar a infecção subgengival em áreas específicas. Assim, são por vezes usados antibióticos para melhorar a cicatrização e a cura, ao suprimir bactérias específicas que não podem ser removidas através de terapia mecânica por si só (Wang e Cooke, 2005).

Para além do tratamento periodontal convencional, poderão ser adoptados tratamentos periodontais que visam a regeneração do periodonto.

O objectivo da terapia regenerativa é a reprodução ou a reconstituição dos tecidos do periodonto perdidos ou danificados, para que a sua arquitectura e funcionalidade sejam recuperadas, ou seja, a obtenção de um novo aparelho de suporte, o qual foi perdido devido à doença periodontal. Esta regeneração passa pela obtenção de novos tecidos periodontais, tais como cimento com a inserção de fibras de colagénio, ligamento periodontal e osso alveolar (Kalpidis e Ruben, 2002; Lindhe et al., 2008).

Regeneração periodontal

A regeneração consiste na reprodução ou reconstituição dos tecidos perdidos ou danificados, em contraste com a reparação, que consiste na cicatrização tecidular sem que esta dê origem a uma verdadeira restauração da arquitectura e função dos tecidos (Esposito et al., 2004).

Assim, existem diferenças significativas entre os termos regeneração e reparação. A primeira é definida como o processo biológico pelo qual a arquitectura e a função dos tecidos perdidos são completamente restabelecidas (Hammarstrom, 1997). A verdadeira regeneração periodontal significa cicatrização após o tratamento periodontal que resulta na obtenção de tecidos de suporte perdidos, incluindo novo cimento acelular unido à

superfície dentinária subjacente, novo ligamento periodontal com fibras de colagénio funcionalmente orientadas e inseridas em novo cimento e novo osso alveolar unido ao ligamento periodontal (Hirooka, 1998), surgindo assim, uma nova inserção. Esta nova inserção pode consistir em adesão epitelial e/ou adaptação ou inserção conjuntiva e pode incluir novo cimento (Esposito et al., 2004).

Por outro lado, reparação é o processo biológico pelo qual é restaurada a continuidade com os tecidos danificados por outros tecidos que não replicam a estrutura e a função dos que foram perdidos. Esta consiste na formação de um epitélio juncional longo (Bosshardt, 2008), em que não há uma nova e verdadeira inserção periodontal (Hammarstrom, 1997).

Cicatrização Periodontal

Imediatamente após terapia periodontal, desencadeiam-se cascatas celulares altamente organizadas e reguladas por vários mediadores químicos, factores de crescimento, além de outros reguladores ambientais e locais da ferida, que comandam um processo denominado de cicatrização (Fine, 1981; Oda e Carvalho, 2004). A cicatrização ocorre como resposta a vários tipos de injúrias e tem como objectivo o restabelecimento da estrutura e da função tecidual (Oda e Carvalho, 2004; Takata, 1994). Esta pode desenvolver-se em dois processos: regeneração e reparação.

A regeneração é, obviamente, o processo de cicatrização mais desejado, entretanto, não é o processo que mais acontece (Oda e Carvalho, 2004).

Na descrição clássica do processo de cicatrização há, inicialmente, um reparo temporário caracterizado pela formação de um coágulo no local da ferida. Células inflamatórias migram para o local da injúria em resposta aos microorganismos e às partículas de material estranho, sendo depois seguidas por fibroblastos e células endoteliais que invadem o coágulo para formar tecido de granulação. Finalmente, a maturação da matriz tecidual da ferida é observada junto com a contracção do coágulo (Fine, 1981; Oda e Carvalho, 2004).

Entretanto, a cicatrização do tecido periodontal exhibe algumas particularidades, pois os tecidos periodontais representam um sistema único do corpo humano onde tecido epitelial, tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado se unem para formar uma junção denominada de dentogengival. Com a instalação da doença periodontal, a integridade desta junção é perdida e quando uma terapêutica é executada, o seu resultado

envolve a participação de quatro tipos celulares diferentes: células do epitélio gengival, células do tecido conjuntivo gengival, células do tecido ósseo e células do ligamento periodontal (Aukhil, 2000; Oda e Carvalho, 2004).

Melcher (1976) propôs uma teoria acerca do potencial de reparo dos tecidos periodontais e concluiu que as células que repopulam a superfície da raiz exposta determinam a natureza da forma de inserção. Assim sendo se as células epiteliais proliferarem ao longo da superfície radicular, resultará na formação de epitélio juncional longo. Caso as células do tecido conjuntivo gengival repopulem a mesma região, ocorre inserção na forma de adesão conjuntiva, podendo ocorrer reabsorção radicular. No entanto, se as células ósseas migram e entram em contacto com a superfície radicular, além de reabsorção, anquilose também poderá ocorrer. O ideal, para uma nova e completa inserção se desenvolver é que as células do ligamento periodontal proliferem e recubram a superfície da raiz desnuda. De entre estes modelos de cicatrização, a formação de nova inserção por células do ligamento periodontal junto com restauração óssea caracteriza o processo de regeneração, os demais modelos representam o processo de reparo (Melcher, 1976).

Estudos *in vivo* avaliando os eventos iniciais da cicatrização na interface entre o tecido mucogengival e o dente, demonstraram que inicialmente proteínas do plasma como o fibrinogénio, precipitam sobre a superfície da ferida e promovem uma base inicial para a aderência do coágulo rico em fibrina (Marcantonio et al., 1999; Oda e Carvalho, 2004). Após uma hora, a fase inflamatória inicial é instalada por infiltração de neutrófilos no coágulo abaixo do retalho mucogengival. Com seis horas, a superfície radicular torna-se revestida por neutrófilos que descontaminam a ferida por fagocitose do tecido necrótico e injuriado. Dentro de três dias as reacções inflamatórias orientam-se para a fase tardia com decréscimo gradual do infiltrado de neutrófilos e maior influxo de macrófagos na região da lesão. Os macrófagos contribuem para o desbridamento da ferida através da remoção de células vermelhas do sangue, neutrófilos e restos teciduais e, além disso, actuam libertando factores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos, produção de matriz, proliferação de células musculares lisas e células endoteliais para angiogénese (Oda e Carvalho, 2004). Dentro de sete dias a fase de formação do tecido de granulação é gradualmente introduzida como a terceira fase do processo de cicatrização, na qual um tecido ricamente celular é formado suportando a maturação e remodelação que ocorre pela demanda funcional (Marcantonio et al., 1999;

Oda e Carvalho, 2004; Robertson e Buchanan, 1997).

Enquanto os eventos iniciais de cicatrização na interface retalho mucogengival-dente são similares em qualquer ferida de tecido mole, os processos de maturação e adaptação funcional requerem um mecanismo nas quais as fibras colagêneas se tornam inseridas no cimento ou dentina da raiz instrumentada (Oda e Carvalho, 2004).

Osteogênese, osteoindução e osteocondução

Embora o tecido ósseo mostre um grande potencial de regeneração e possa restaurar completamente a sua estrutura e função originais, os defeitos ósseos podem frequentemente falhar na cicatrização com o tecido ósseo. Admite-se geralmente que os mecanismos biológicos que formam o princípio básico para os enxertos ósseos incluem três processos básicos: osteogênese, osteocondução e osteoindução (Lindhe et al., 2008).

A **osteogênese** ocorre quando osteoblastos e células precursoras de osteoblastos viáveis são transplantadas como material de enxerto para dentro do defeito, onde podem estabelecer centros de formação óssea. Osso autógeno do íliaco e enxertos de osso medular são exemplos de transplantes com propriedades osteogênicas (Lindhe et al., 2008).

A **osteocondução** ocorre quando material de enxerto não vital serve como um arcabouço para o crescimento de células precursoras dos osteoblastos para o interior do defeito. Esse processo é usualmente seguido por uma reabsorção gradual do material do enxerto. Osso cortical autógeno ou osso alógeno de bancos de tecidos podem ser citados como exemplos de materiais de enxerto com propriedades osteocondutoras. Tais materiais de enxerto bem como materiais de enxerto derivado de osso ou osso sintético têm propriedades osteocondutoras similares. Porém, a degradação e a substituição por osso viável frequentemente são deficientes (Lindhe et al., 2008).

A **osteoindução** envolve a formação de um novo osso pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de osso sob influência de um ou mais agentes indutores. A matriz óssea desmineralizada ou as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) são exemplos de tais materiais de enxerto (Lindhe et al., 2008).

Definição de Engenharia Tissular

Em 1993, Langer et al. propuseram a engenharia tissular como uma técnica possível para regenerar tecidos perdidos sendo que a restauração de vários tecidos e

órgãos humanos está a começar a tornar-se realidade. O conceito de engenharia tissular foi introduzido originalmente para resolver a escassez crónica de órgãos doados (Langer et al, 1993).

Uma definição uniforme de engenharia tissular, como afirma Langer e Vacanti, é "um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos, com o objectivo de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido ou de um órgão inteiro" (Langer e Vacanti, 1993).

Engenharia tissular tem como objectivo estimular o corpo, quer para regenerar o tecido por conta própria, ou para cultivar tecidos fora do corpo que podem ser implantados em tecido natural (Peng et al., 2009).

Engenharia tissular é um campo relativamente novo, mas rapidamente emergente com grande potencial para transformar profundamente o cuidado do paciente. O objectivo final de engenharia tissular é aproveitar as capacidades do próprio corpo para regenerar o tecido funcional e fisiologicamente activo, que responde a estímulos metabólicos. Essa regeneração ocorre através da recapitulação dos principais eventos que ocorrem durante a formação e o crescimento do tecido.

Apesar dos significativos avanços estarem a ocorrer rapidamente, a maioria das terapias regenerativas ainda estão em fase de desenvolvimento (Nussenbaum e Krebsbach, 2006).

Para a engenharia tissular é essencial uma tríade composta por células estaminais, uma matriz tridimensional e proteínas sinalizadoras, denominadas factores de crescimento osteoindutores, para o estímulo da diferenciação celular (Lee et al., 2009).

A função desta matriz é suportar a colonização celular, migração, crescimento e diferenciação, e guiar o desenvolvimento de novo tecido e/ou actuar como dispositivo de entrega de drogas. A matriz ideal deve suportar nova formação óssea e em seguida a precoce mineralização, permitindo ao mesmo tempo a sua própria biodegradação uma vez que tenha servido as suas funções. Entre os diferentes biomateriais a serem usados como matrizes, a hidroxiapatite (HA) e o fosfato de cálcio baseado em cerâmicas são os mais populares, sendo estudados devido à sua osteoconductividade, biocompatibilidade e à sua capacidade de integrar o osso do hospedeiro (Heise et al., 1990; Ge et al., 2004; Krut et al., 2004; Mastrogiacomo et al., 2006).

Relativamente aos factores osteoindutores ósseos, os mais pesquisados são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que pertencem à superfamília- β do factor

transformador de crescimento (TGF). Estas foram descobertas por Marshall Urist, em 1965 (Urist 1965; Vandeputte e Urist 1965). Até à data, pelo menos 20 membros desta família de citocinas foram identificadas (Carlisle e Fischgrund 2005; Giannoudis e Tzioupis 2005), e as mais amplamente usados são BMP-2 e BMP-7 (também conhecidas como proteínas osteogénicas (OP-1)). Alguns desses factores estimulam a diferenciação de células osteoprogenitoras e a actividade sintética (Lind 1998; Reddi 2001; Chen et al. 2004) e têm sido usadas experimentalmente como fusão vertebral e tratamento da pseudoartrose. Estes factores solúveis exigem um transportador menos solúvel para expressar a sua potencialidade biológica. Muitos materiais, como as folhas de colagénio, polímeros de ácido poliláctico, ou HA com colagénio tipo I, têm sido usados como transportadores. Contudo, não está estabelecido qual é o transportador mais efectivo (Lee et al., 2009).

As abordagens actuais para a engenharia tissular podem dividir-se basicamente em dois tipos principais: *ex vivo* e *in vivo*. No primeiro caso, o tecido-alvo é criado, num laboratório de cultivo de células, em matrizes biodegradáveis na presença de determinados factores tróficos antes do seu transplante para o corpo. Na última abordagem, os três elementos acima mencionados são colocados num defeito do tecido *in situ* e, o tecido é restaurado através da maximização da capacidade de cura natural do corpo, criando um ambiente local favorável para a regeneração (Nakahara, 2006).

Técnicas de Regeneração actuais

A regeneração dos tecidos periodontais perdidos devido a doença periodontal tem sido o objectivo ideal da terapia periodontal (Cochran et al., 2003).

No início da década de 80, uma série de estudos experimentais foram conduzidos de modo a ser possível regenerar os tecidos de inserção periodontal (Sculean et al., 2006). Desde então, são diversas as abordagens que têm sido utilizadas, sempre com um objectivo comum: a formação de novo cemento com fibras de colagénio inseridas, novo ligamento periodontal e novo osso alveolar.

As primeiras tentativas envolviam os enxertos ósseos. Estes contêm todos os elementos chave requeridos para reparação óssea: uma matriz osteocondutora, factores de crescimento para osteoindução, células com potencial osteogénico e vascularização do novo osso. Porém a utilização de enxertos ósseos na prática clínica apresenta inúmeros inconvenientes. A percentagem de sucesso é elevada, mas complicações

(Charles et al., 2007; Lee et al., 2009) ou a não união (Muramatsu et al., 2003; Soucacos et al. 2006) são comuns especialmente em grandes reconstruções. Mais ainda, a regeneração do local receptor nem sempre é totalmente cumprido (Wheeler et al. 2001; Wheeler e Enneking 2005). Acrescendo ainda a significativa morbilidade do local dador do enxerto (Laurie et al., 1984). A utilização de enxertos de cadáveres humanos e de animais para bancos ósseos previne o problema da morbilidade do local dador, no entanto, apresenta o risco potencial de infecção viral ou bacteriana e de uma resposta imune por parte do tecido hospedeiro após a implantação (Stevenson, 1987; Wang e Cooke, 2005). Contudo, enxertos de substituição óssea, tais como enxertos autólogos, aloenxertos, xenoenxertos e materiais aloplásticos, permanecem entre as estratégias terapêuticas mais utilizadas para a correcção de defeitos ósseos periodontais.

Resultados de revisões sistemáticas indicam que os materiais de enxerto ósseo fornecem melhorias clínicas visíveis em defeitos ósseos periodontais comparativamente com desbridamento cirúrgico sozinho (Research, Science and therapy committee, 2005).

Inicialmente surgiram os enxertos autólogos de fontes extra-oral e intra-oral que devido ao seu potencial osteogénico têm sido usados em terapia periodontal. Os enxertos ósseos autólogos na generalidade têm tido resultados favoráveis. No entanto, fontes extra-orais como enxertos da crista ilíaca têm uso limitado devido à dificuldade em obter o material de enxerto, morbilidade e a possibilidade de reabsorção radicular. A tuberosidade maxilar, o mento ou o ramo montante da mandíbula, são geralmente a escolha de doação para o osso de enxerto autólogo. Em situações onde o osso autólogo existente é insuficiente, aloenxertos podem ser utilizados. Aloenxertos são enxertos com origem em indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes. São normalmente retirados a partir de ossos de cadáveres e tratados. No entanto, esta abordagem envolve uma série de preocupações, dentro das quais se inclui infecção, rejeição imunológica e doença enxerto-hospedeiro (Wan et al., 2006). Posteriormente surgem os xenoenxertos, que se tratam de enxertos derivados de um dador de outra espécie, sendo também referido como osso inorgânico (Cohen et al., 2001; Wang e Cooke, 2005). Até ao momento, há muito poucos dados clínicos que apoiem o uso de xenoenxertos em defeitos periodontais (Melloning, 2000; Wang e Cooke, 2005). A preocupação com o risco de transmissão de doenças derivadas de produtos bovinos como a BSE tornou-se uma realidade, pondo em causa a sua aplicação (Sogal e Tofe, 1999; Wang e Cooke, 2005). No entanto, estimativas da análise de risco da possibilidade

de transmissão de doenças como a BSE a partir de substitutos de enxerto ósseo de origem bovina, relataram tais riscos insignificantes (Research, Science and therapy committee, 2005). Mais tarde surgem os materiais aloplásticos. Estes funcionam como substitutos ósseos sintéticos, inorgânicos, biocompatíveis e/ou bioativos. Acredita-se que estes materiais sintéticos promovem a cicatrização óssea através de osteocondução (Cohen et al., 2001; Wang e Cooke, 2005). Actualmente, existem quatro tipos de materiais aloplásticos frequentemente utilizados na cirurgia periodontal regenerativa: Hidroxiapatite, beta-fosfato-tricálcico, polímeros e biovidros. No geral, o efeito dos materiais aloplásticos tem sido inconsistente (Reynolds et al., 2003; Wang e Cooke, 2005). Avaliações histológicas de dentes tratados referem limitado potencial de regeneração para estes materiais, com regeneração óssea mínima, não havendo sinais de formação de novo cemento ou ligamento periodontal. Estudos futuros nesta área são certamente necessários para melhor entender como esses materiais de trabalho se comportam (Research, Science and therapy committee, 2005).

Em 1976, Melcher, baseando-se no seu conceito de compartimentação, constata que após o alisamento radicular ou a cirurgia de retalho o repovoamento da superfície radicular curetada pode ser feita por 4 tipos de células: células epiteliais, células do tecido conjuntivo, células derivadas do osso e células do ligamento periodontal. Mais tarde, Melcher sugere que a verdadeira regeneração periodontal estava dependente do repovoamento por células que restavam do ligamento periodontal (Melcher et al., 1987). No entanto, é sabido que, as células do ligamento periodontal migram a uma velocidade inferior às células epiteliais, sendo estas as primeiras células a chegarem à superfície radicular descontaminada, originando um epitélio juncional longo, sem se verificar uma verdadeira regeneração dos tecidos periodontais, a não ser que algum tipo de barreira física fosse incluído no local. Surge então um conceito conhecido como regeneração tecidual guiada (RTG) (Cochran et al., 2003).

A aplicação clínica da regeneração tecidual guiada (RTG) na terapia periodontal envolve a colocação de uma barreira física para garantir que a superfície radicular previamente afectada pela periodontite seja repovoada com células do ligamento periodontal (Murphy e Gunsolley, 2003).

Inicialmente, foram usadas membranas não reabsorvíveis, as quais tinham que ser removidas numa segunda cirurgia. Para além de causar maior incómodo para o paciente, provocava também um potencial trauma para os tecidos periodontais imaturos

que seguiam o seu processo de regeneração. (Sculean, 2006). A partir de 1990 foram desenvolvidos procedimentos de um passo através da utilização de membranas reabsorvíveis (Sculean, 2006).

Estudos de Pontoriero et al. (1992) e Lindhe et al. (1995) documentaram que membranas reabsorvíveis proporcionaram uma barreira igualmente efectiva relativamente às membranas de Teflon não reabsorvíveis (Lindhe et al., 2008; Villar e Cochran, 2010).

Membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis têm sido estudadas e não foram detectadas diferenças entre os dois tipos de barreira. Uma vez que as membranas não reabsorvíveis requerem um segundo procedimento cirúrgico para remoção das membranas, as membranas reabsorvíveis são comumente usadas (Wang e Cooke, 2005).

Além de favorecer o repovoamento selectivo da área da ferida, as barreiras físicas contribuem também para a protecção do coágulo de sangue durante as fases iniciais de cicatrização, bem como garantem a manutenção do espaço para o desenvolvimento de um novo aparato periodontal (Villar e Cochran, 2010).

No entanto, exemplares histológicos de alguns locais regenerados com a técnica de RTG revelaram que existe com frequência um defeito entre o cimento regenerado e a dentina radicular. Assim, foi defendido que a nova inserção entre o cimento regenerado, obtido pela RTG e, a dentina radicular não seria tão forte como a inserção entre o cimento e a dentina radicular originais (Sculean, 2006). O termo regeneração associado à técnica de RTG foi então questionado, resultante da diferença existente entre o cimento formado por intermédio desta técnica relativamente ao cimento formado durante o desenvolvimento dentário, o cimento acelular (Sculean, 2006).

Em 1997, foi introduzida uma nova abordagem baseada na formação dentária embrionária, a utilização de proteínas derivadas da matriz de esmalte (EMD). Esta abordagem utiliza um extracto de matriz de esmalte embrionário, o qual parece induzir as células mesenquimais a mimetizar o processo que se desenrola durante o desenvolvimento da raiz dentária e dos tecidos periodontais (Froum et al., 2004; Venezia et al., 2004).

EMD trata-se do conjunto de proteínas amelogeninas hidrofóbicas extraídas da matriz de esmalte suína. O potencial de regeneração do periodonto lesado com a EMD tem sido demonstrado em várias pesquisas histológicas em humanos (Froum et al.,

2004). Proteínas da matriz do esmalte, secretadas pela bainha de Hertwig, parecem desempenhar um papel importante na cementogênese e no desenvolvimento dos aparelhos de inserção periodontal. *In vitro*, o derivado da matriz de esmalte estimula o crescimento celular e a diferenciação das células mesenquimais, incluindo osteoblastos. *In vivo*, tem sido usado cada vez mais na promoção da regeneração dos tecidos periodontais com resultados promissores.

É sabido que as plaquetas contribuem para a homeostase, evitando a perda de sangue em locais de lesão vascular, e contêm um grande número de factores de crescimento e citoquinas que desempenham um papel fundamental na inflamação e reparo tecidual. Tal facto, levou ao uso de plaquetas como ferramentas terapêuticas para melhorar a cicatrização, particularmente em pacientes ou condições em que o reparo do tecido é danificado ou significativamente atrasado (Cáceres et al., 2008).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido após a centrifugação do sangue. O resultado é uma concentração acentuada de plaquetas num volume plasmático reduzido (Dori et al., 2009). Foi sugerido que a aplicação do PRP pode melhorar a cicatrização de feridas, encurtar o período de cicatrização e aumentar a taxa de deposição óssea e volume ósseo, em combinação com enxertos em procedimentos de enxertos ósseos. Estes efeitos do PRP na cicatrização óssea foram atribuídos à angiogénese, proliferação, diferenciação e ao resultado das altas concentrações do factor de crescimento transformador-beta e do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) contidas no PRP em altas concentrações (Dori et al., 2008).

PGFs revelam uma potencial aplicação na regeneração periodontal. Várias PGFs foram identificadas nos tecidos periodontais através de processos imunohistoquímicos e hibridização *in situ*. Estas PGFs demonstraram a capacidade de promover o crescimento celular, diferenciação *in vitro* e regeneração periodontal em animais. Estudos humanos *in vivo* acerca do papel das PGFs na regeneração periodontal são limitados. De todas as PGFs conhecidas, o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) demonstrou exercer um efeito favorável na regeneração periodontal, representado pelo ganho de inserção clínica e radiográfica de defeitos de preenchimento em humanos (Camargo et al., 2009).

PRP combinado com diferentes materiais de enxerto, membranas de barreira ou derivados da proteína da matriz de esmalte também tem sido usado na terapia periodontal regenerativa com variados graus de sucesso. No entanto, dados de estudos

clínicos avaliando o efeito da permanência do PRP quando usado em combinação com diferentes materiais de enxerto são um pouco controversos (Dori et al., 2009).

Novas abordagens terapêuticas

As terapias atrás mencionadas têm sucesso limitado não só pela severidade da doença periodontal, bem como pelo tipo de defeito desta resultante e por factores quer locais quer sistémicos, entre outros. Na tentativa de ultrapassar estas limitações, têm sido propostas recentes técnicas de engenharia tissular, baseadas na biologia de células estaminais, como forma de regeneração do periodonto destruído pela doença periodontal.

As células estaminais são células indiferenciadas definidas pela sua capacidade de se auto-renovar e diferenciar, tanto *in vivo* como *in vitro*, de forma a originar múltiplas linhas celulares. Dependendo dos sinais estimuladores que recebem, as células estaminais podem-se diferenciar em qualquer tipo de célula especializada.

Existem dois grupos major de células estaminais: as células estaminais embrionárias e as células estaminais adultas. Dependendo do seu tipo e sob certas condições, estas células indiferenciadas podem ainda ser classificadas em células pluripotentes, quando têm a capacidade de originar diferentes tipos de células derivadas das três camadas germinativas: mesoderme, ectoderme e endoderme, bem como em células multipotentes, quando apresentam capacidade de dar origem a tipos celulares específicos (Kim et al., 2009).

As células estaminais embrionárias são derivadas de blastocistos de mamíferos. No entanto, o isolamento e utilização de células estaminais embrionárias humanas são difíceis e estão frequentemente envolvidos em polémicas éticas, religiosas e políticas. Por outro lado, as células estaminais adultas (pós-natais) que existem em vários órgãos do corpo são de fácil acesso. Uma das características mais importantes das células estaminais adultas é o facto de que estas podem ser expandidas com eficiência e induzidas a diferenciarem-se em múltiplas linhas celulares. Existem várias fontes de células estaminais adultas, entre elas a medula óssea, o sangue, a córnea e a retina, o cordão umbilical, o fígado, o tracto gastrointestinal e o pâncreas (Kim et al., 2009).

Células estaminais de tecidos adultos apresentam menos problemas éticos na sua utilização e, a sua propensão para a formação de neoplasias, como teratomas, é muito menor. A sua utilização na prática clínica também está melhor documentada e

pesquisada (Wakitani et al. 2002; Wakitani et al. 2004; Wakitani et al. 2007). Células estaminais dão origem a células progenitoras das quais se distinguem pela sua capacidade de auto-renovação por um processo de divisão celular assimétrico. Em contraste, as células progenitoras têm uma capacidade limitada de auto-renovação e, por definição, situam-se entre uma célula estaminal e uma célula terminalmente diferenciada (Muschler e Midura, 2002; Muschler et al. 2003; Muschler et al. 2004). Existem exceções pois as células progenitoras têm demonstrado “plasticidade”, ou seja, elas têm a capacidade de se diferenciar em fenótipos não restritos ao tecido dos quais são derivados (Grove et al. 2004; Herzog et al. 2003). Actualmente, existem dois tipos principais de células estaminais adultas que são usados na prática clínica, células estaminais hematopoéticas (HSC) e células estaminais da medula óssea não-hematopoiética (MSC). As MSCs são encontradas no estroma da medula óssea não-hematopoiética e são designadas de células estaminais do estroma medular (BMSCs). Outro recurso de MSCs inclui o perióstio, membranas sinoviais, pele, tecido adiposo e tecido esquelético (Caplan, 1991; Caplan, 1994; Cao e Huard, 2004). É sabido que os osteoclastos são derivados das HSCs da medula, enquanto que os osteoblastos e osteócitos, responsáveis pela formação óssea, são derivados das MSCs da medula. Uma característica importante das MSCs a partir de diferentes fontes é a sua habilidade de se diferenciar em múltiplos fenótipos incluindo osso, cartilagem, tendões, tecido adiposo, músculo e nervos (Caplan, 1991; Muschler et al., 2004; Pittenger et al., 1999), o que significa que estas células transportadas de um único tecido podem ser usadas para formar um tecido diferente. Outra característica fundamental das MSCs é a sua rápida expansão *in vitro* sem perda das características das células progenitoras (Deasy et al., 2005). Na prática clínica, o recurso mais amplamente utilizado de células estaminais multipotentes é a medula óssea. A aspiração da medula óssea, normalmente da crista ilíaca, é simples, estando associada a uma menor morbidade (Muschler et al., 1997). MSCs derivadas da medula óssea podem ser isoladas por aspiração da medula óssea, pois têm capacidade de aderir às placas de cultura. São células relativamente subdesenvolvidas e pluripotentes, que possuem uma capacidade única para se diferenciar em várias linhas celulares quando em condições adequadas.

Muitas pesquisas têm mostrado células estaminais mesenquimais da medula óssea como representando uma potencial fonte para a engenharia de tecido ósseo. MSCs seriam induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos restaurando os defeitos ósseos.

Além disso, algumas pesquisas demonstraram que MSCs poderiam melhorar a cicatrização do tendão do músculo, cujas fibras do tecido são semelhantes ao ligamento periodontal.

Nos últimos anos, algumas pesquisas descobriram que as células mesenquimais da medula óssea (MSCs) podem acelerar a regeneração do tecido periodontal. Kawaguchi et al. autotransplantaram MSCs em defeitos experimentais classe III e concluíram que os defeitos encontrados no grupo de teste foram regenerados por cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Kawaguchi et al., 2004).

Os dados actuais sugerem que as MSCs da medula óssea transplantadas diferenciam-se em fenótipos das células danificadas *in vivo* sob a influência de factores relacionados com o hospedeiro. As interações mútuas entre MSCs e o microambiente destinatário determinam os resultados a longo prazo da regeneração de tecidos funcionais. O microambiente das MSCs inclui muitas citocinas, factores de crescimento dissolúveis e matriz extracelular. Esses elementos locais induzem a diferenciação das células transplantadas em células funcionais específicas.

Recorrendo à imunoistoquímica e hibridização *in situ* em co-culturas de células estaminais mesenquimais e do ligamento periodontal, Kramer encontrou um aumento significativo na expressão por parte das células estaminais mesenquimais de osteocalcina e osteopontina e uma diminuição significativa na expressão de sialoproteína óssea, características do ligamento periodontal. Eles concluíram que o contacto com factores do ligamento periodontal induziriam as células estaminais mesenquimais a obter características semelhantes às do ligamento periodontal (Kramer et al., 2004). Liechty chamou a esse fenómeno de diferenciação local específica. Fenómeno esse que tem sido interpretado por alguns pesquisadores como um caso extremo de adaptabilidade das células estaminais a cada microambiente tecidual.

Até à data, muitas pesquisas têm demonstrado a eficácia das células estaminais em terapias regenerativas de defeitos periodontais em animais experimentais. Provou-se que vários factores de crescimento foram fundamentais para o desenvolvimento, maturação, manutenção e restauração dos tecidos periodontais, uma vez que eles estabeleceram um microambiente periodontal, favorável ao crescimento de células e tecidos (Zhao et al., 2008).

Com base nestes dados de pesquisa discutidos acima, acredita-se que MSCs se iriam diferenciar em células periodontais adequadas no microambiente periodontal.

BMSCs foram testadas pela sua capacidade de recriar tecidos periodontais e restaurar defeitos periodontais. Foi provado que o transplante de auto-BMSCs é capaz de formar *in vivo* cimento, ligamento periodontal e osso alveolar após implante em locais com defeito periodontal. Assim, a medula óssea fornece uma fonte alternativa de MSC para o tratamento de doenças periodontais (Kawaguchi et al., 2004).

BMSCs são capazes de se diferenciar em várias linhagens de células quando cultivadas em condições definidas *in vitro*, incluindo linhagens osteogénica, condrogénica, adipogénica, miogénica e neurogénica (Huang et al., 2009).

A maioria das amostras experimentais mostraram uma quantidade significativa de osso novo e uma largura adequada do ligamento periodontal foi observado. A superfície radicular desnudada foi quase completamente coberta por novo cimento e ligamento periodontal regenerado separando o cimento de uma nova forma de osso. No entanto, a reconstrução do osso alveolar completa ainda não foi obtida.

O mecanismo exacto pelo qual as MSCs se diferenciam em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal é desconhecido. Estudos anteriores *in vivo* revelaram que factores do hospedeiro influenciaram MSCs transplantados a diferenciarem-se em várias células de tecidos conjuntivos. Foi também relatado que o microambiente e tecido circundante fornecem os nutrientes, factores de crescimento e matrizes extracelulares que contribuem para a diferenciação das MSCs (Hasegawa et al., 2006).

É também importante salientar que a rejeição das células estaminais alogénicas por um hospedeiro imunocompetente é insignificante após o implante, provavelmente devido aos efeitos imunossupressores destas células (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002; Uchida et al., 1998). A falta de uma resposta imune sugere uma alta probabilidade de sucesso para a utilização de células estaminais mesenquimais em protocolos clínicos. O achado mais recente nesta área suporta e estende esse conceito, mostrando que a engenharia de tecidos com células estaminais mesenquimais tem sido bem sucedida na produção de osso (Boo et al., 2002; Kramer et al., 2004; Partridge et al., 2002).

Devido a algumas lacunas de obtenção do BMSCs incluindo dor, morbidade, e número de células baixo na colheita, fontes alternativas de células estaminais têm sido procuradas (Huang et al., 2009).

Nem todos os cientistas identificaram as BMSCs como as células ideais para a

engenharia tissular. Jing assinalou que a diferenciação das habilidades BMSCs diminui significativamente com o aumento da idade dos dadores. (Jing et al., 2008). Jing defende que as células estaminais do tecido adiposo podem ser induzidas em linhagem odontogénica e utilizadas como adequadas para a implantação de células de regeneração em pacientes idosos (Jing et al., 2008).

Células estaminais do tecido adiposo (ADSCs) são consideradas por conter um grupo de células estaminais mesenquimais pluripotentes e manifestam capacidade de diferenciação em multilinhagens, incluindo condrogénese, osteogénese e adipogénese. (Liu et al., 2007). ADSCs apresentam crescimento e cinética de proliferação estáveis *in vitro*. O tecido adiposo pode ser obtido por métodos menos invasivos e em quantidades maiores que as células da medula óssea, tornando o uso de hADSCs como fonte de células estaminais muito atraente (Zuk et al., 2002).

Foi relatado que as ADSCs expressaram proteínas marcadoras de osso incluindo fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina e produziram matriz mineralizada. Num estudo actual, a capacidade das ADSCs para formar matriz óssea *in vivo* foi determinada, mostrando uma nova terapêutica para a reparação e regeneração óssea (Hicok et al., 2004; Peng et al., 2009).

Para além das ADSCs, fontes intra-orais de células estaminais foram pesquisadas na tentativa de combater as desvantagens das BMCSs, como sendo a dor e a morbilidade do local dador. Surgem assim células como as células estaminais provenientes de dentes humanos decíduos esfoliados (SHED), células estaminais derivadas da polpa dentária (DPSCs), células estaminais do folículo dentário (DFSCs) e as células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs), as quais irei descrever mais pormenorizadamente a seguir.

As células estaminais provenientes de dentes decíduos esfoliados (SHED):

São recolhidas directamente da câmara pulpar de dentes decíduos esfoliados. Miura et al. descobriram que as SHED são capazes de se diferenciar em células neuronais, adipócitos e odontoblastos, quando estão no ambiente indicado, levando à síntese de novo osso. Porém, esta estirpe de células é incapaz de formar ligamento periodontal e cimento radicular (Miura et al., 2003).

Apesar de serem identificadas pelos mesmos marcadores que as células

estaminais da polpa dentária, apresentam, no entanto, taxas mais elevadas de proliferação e plasticidade (Miura et al., 2003).

A descoberta de células estaminais em dentes decíduos (Miura et al., 2003) lança uma luz sobre a intrigante possibilidade de usar células estaminais da polpa dentária em engenharia tissular (Murray e Garcia-Godoy, 2004; Sloan e Smith, 2007). As vantagens óbvias destas células em relação às células estaminais de dentes permanentes são a maior taxa de proliferação, a facilidade de serem expandidas *in vitro*, a alta plasticidade, o facto de se poderem diferenciar em neurónios, adipócitos, osteoblastos e odontoblastos bem como o facto de serem facilmente acessíveis em pacientes jovens (Miura et al., 2003). No entanto, Miura demonstrou que estas células não se poderiam diferenciar directamente em osteoblastos, mas sim induzir a formação de novo osso através do recrutamento de células osteogénicas por formação de um modelo osteoindutor. Estas células distinguem-se pela sua capacidade osteoindutora e alta plasticidade (Miura et al., 2003).

Para além disso, Cordeiro et al. observaram um aumento na densidade dos microvasos na co-implantação. Eles também verificaram que as células transplantadas foram capazes de se diferenciar em vasos sanguíneos que se anastomosaram com a vasculatura do paciente (Cordeiro et al., 2008).

Estas conclusões implicam que os dentes decíduos podem não só fornecer orientações para a erupção dos dentes permanentes, como geralmente se supõe, mas também podem estar envolvidos na indução da formação óssea durante a erupção dos dentes permanentes (Huang et al., 2009).

Os dentes decíduos podem, portanto, ser um recurso ideal de células estaminais para reparar estruturas de dente danificado, induzir a regeneração óssea e, possivelmente, para tratar lesão no tecido neural ou doenças degenerativas. No entanto, a importância biológica da existência de SHED continua a estar por determinar (Miura et al., 2003).

Células estaminais da polpa dentária (DPSCs):

A capacidade regenerativa da dentição humana/polpa leva os cientistas a concluir que a polpa dentária pode conter os progenitores responsáveis pela reparação da dentina. Gronthos identificou pela primeira vez células adultas da polpa dentária (DPSCs) humana e, concluiu que DPSCs poderiam regenerar um complexo

dentina-polpa, que é composto por matriz mineralizada com túbulos alinhados com odontoblastos e tecido fibroso, contendo vasos sanguíneos num arranjo similar ao complexo dentina-polpa encontrada em dentes humanos naturais (Gronthos et al., 2000).

Gronthos et al. verificaram que DPSCs possuíam a capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhas celulares, visto que as DPSCs foram capazes de formar dentina ectópica e tecido pulpar associado *in vivo* e de se diferenciarem em adipócitos e células do tipo neurais (Gronthos et al., 2000). Um estudo *in vivo* mostrou que DPSCs produziam também estrutura óssea quando implantados em locais subcutâneos em ratos imunocomprometidos (Otaki et al., 2007; Mao et al., 2006; Papaccio et al., 2006;).

Comprovando esse facto, surge um estudo realizado por Carinci e seus colegas onde identificaram uma subpopulação de células estaminais derivadas da polpa dentária humana com potencial osteogénico formando uma espécie de tecido ósseo *in vivo* (Carinci et al., 2008; Huang et al., 2009).

Mais recentemente, foi também demonstrado que DPSCs também podiam sofrer diferenciação condrogénica e miogénica *in vitro*, para além da diferenciação osteogénica (d'Aquino et al., 2007; Huang et al., 2009; Laino et al., 2005; Zang et al., 2006).

Embora a capacidade regenerativa do complexo humano dentina/polpa não seja bem compreendido, é sabido que, após lesão, dentina reparadora é formada como uma barreira protectora para a polpa (Murray et al., 2001). Assim, pode-se antecipar que a polpa dentária contém os progenitores dentinogénicos responsáveis pela reparação da dentina. Trabalhos anteriores demonstraram que a polpa contém células proliferativas que são análogas às células do osso, porque expressam marcadores osteogénicos e respondem a vários factores de crescimento para a diferenciação osteo/odontogénica (Hanks et al., 1998; Ueno et al., 2001; Unda et al., 2000). Além disso, as células da polpa dentária são capazes de formar depósitos minerais com estruturas cristalinas distintas semelhantes a dentina (About et al., 2000; Couble et al., 2000; Gronthos et al., 2000; Mao et al., 2006).

Células estaminais do folículo dentário (DFSC):

O folículo dentário é um tecido mesenquimal que rodeia o gérmen dentário em desenvolvimento. Durante a formação da raiz do dente, componentes periodontais tais

como cimento, ligamento periodontal (PDL) e osso alveolar, são criados por células progenitoras do folículo dentário (Yokoi et al., 2007). As células estaminais do folículo dentário (DFSCs) foram isoladas a partir de folículos de terceiros molares humanos. Foi experimentalmente comprovado que as DFSCs são capazes de se diferenciar em osteoblastos/cementoblastos, adipócitos e neurónios (Coura et al., 2008; Kémoun et al., 2007; Yao et al., 2008). Além disso, células imortalizadas do folículo dentário, foram transplantadas em ratos imunocomprometidos sendo capazes de recriar um novo tecido semelhante ao ligamento após 4 semanas (Yokoi et al., 2007). Assim sendo, estas células podem ser uma ferramenta de pesquisa útil para estudar a formação de ligamento periodontal e para o desenvolvimento de terapias de regeneração.

Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs):

O ligamento periodontal (PDL) é um tecido conjuntivo especializado, derivado do folículo dentário e com origem em células da crista neural (Mao et al., 2006). Trata-se de um tecido mole conectivo encaixado entre o cimento e a parede interna da cavidade do osso alveolar, com a função de suporte dos dentes nos maxilares. O PDL não tem apenas um papel importante no suporte dos dentes, mas também contribui para a nutrição do dente, a homeostase e a reparação de danos nos tecidos (Seo et al., 2004). PDL contém populações heterogêneas de células que se podem diferenciar tanto em células formadoras de cimento (cementoblastos), como em células formadoras de osso (osteoblastos) (Isaka et al., 2001; McCulloch e Bordin, 1991). A presença de vários tipos de células no PDL levou à especulação de que este tecido pode conter células progenitoras que mantêm a homeostase dos tecidos e são responsáveis pela regeneração dos tecidos periodontais (Seo et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que as células estaminais mesenquimais obtidas a partir do ligamento periodontal (PDLSCs) são células multipotentes com características semelhantes às BMSCs e DPSCs, capazes de desenvolver diferentes tipos de tecidos, como osso, dente e tecidos associados. Foi relatado que PDLSCs podem diferenciar-se em células que podem colonizar e crescer em scaffolds biocompatíveis, sugerindo uma fonte autóloga de células estaminais fácil e eficiente para engenharia de tecido ósseo na medicina dentária regenerativa (Trubiani et al., 2009).

Além da capacidade osteogénica, a diferenciação de PDLSCs em linhagens cementoblásticas também foi enfatizada. Quando transplantadas em ratos, as PDLSCs

induzidas mostraram capacidade regenerativa dos tecidos com a produção de estruturas semelhantes a cemento/ligamento periodontal, caracterizadas como sendo uma camada de tecidos mineralizados semelhante ao cemento relacionados com as fibras colagêneas semelhantes às do ligamento periodontal (Yang et al., 2009).

Similar a outras células estaminais dentárias já descritas acima, as PDLSCs apresentam características osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas sob condições de cultura definidas (Gay et al., 2007; Lindroos et al., 2008; Xu et al., 2009).

Após o transplante de hPDLSCs em defeitos periodontais de ratos imunocomprometidos, para além de tecido tipo ligamento periodontal regenerado, as hPDLSCs foram também identificadas como estando estreitamente associadas com o osso trabecular relacionado com o PDL regenerado, sugerindo seu envolvimento na regeneração do osso alveolar (Huang et al., 2009; Seo et al., 2004).

Um estudo recente em porcos tem mostrado que os defeitos periodontais podem ser reparados mediante a aplicação da PDLSCs (Liu et al., 2008). Este tratamento mediado por PDSC resultou na regeneração do PDL e recuperação da altura do osso alveolar. Este foi o primeiro relatório que demonstrou a aplicação de PDLSC autólogo para regenerar PDL e a altura do osso alveolar, num modelo animal de grande porte (Huang et al., 2009).

O ligamento periodontal humano revela-se, assim, como uma fonte alternativa viável para possíveis precursores primitivos a serem utilizados em terapias com células estaminais (Coura et al., 2008; Mao et al., 2006).

Conclusão

Depois da recuperação da saúde do tecido periodontal, segue-se a regeneração dos tecidos periodontais perdidos durante a actividade da doença periodontal.

Desde a década de 80 que uma série de estudos experimentais têm vindo a ser desenvolvidos em busca da melhor técnica para proporcionar a regeneração dos tecidos periodontais. No entanto, as técnicas até então desenvolvidas não proporcionam uma verdadeira regeneração periodontal com formação de novo osso alveolar, novo cemento com fibras de colagénio inseridas e novo ligamento periodontal.

Como forma de ultrapassar essas limitações têm sido propostas técnicas de engenharia tissular baseadas na biologia das células estaminais. Essas técnicas apesar de ainda terem poucos resultados *in vivo*, já revelam resultados promissores *in vitro* no que respeita à regeneração periodontal devido à capacidade que as células estaminais apresentam de se diferenciarem em múltiplas linhas celulares à semelhança do que acontece nas células embrionárias.

Após a revisão bibliográfica efectuada conclui que apesar das células estaminais derivadas da medula óssea serem as células estaminais que melhor reproduzem a regeneração periodontal desejada, com formação de novo cemento, novo ligamento periodontal e novo osso alveolar, a dor associada à aspiração da medula, a morbilidade, e o baixo número de células nas colheitas, exigiu que fontes alternativas de células estaminais fossem procuradas. Surgem assim as células estaminais de origem intra-oral, das quais as únicas que proporcionam uma verdadeira regeneração periodontal são as células do ligamento periodontal, existindo no entanto alguns resultados promissores no que diz respeito às células do folículo dentário. No entanto, os mecanismos pelos quais estas células se diferenciam em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal são ainda desconhecidos.

Podemos então concluir que a utilização de células estaminais constitui uma possível opção para o tratamento de defeitos periodontais. No entanto, apesar de esta técnica apresentar resultados promissores, mais estudos futuros são necessários para compreender melhor o papel específico destas células na regeneração, principalmente em humanos.

Bibliografia

1. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 2000; 258: 33-41
2. Armitage GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc* 2009; 140: 36S-43S
3. Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontology* 2000; 22: 44-50
4. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42-48
5. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibrino Y, Okada K, Hata K, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg* 2002; 13: 231-239
6. Bosshardt D. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8): 87-105
7. Cáceres M, Hidalgo R, Sanz A, Martinez J, Riera P, Smith PC. Effect of platelet-rich plasma on cell adhesion, cell migration, and myofibroblastic differentiation in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2008; 79: 714-720
8. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Divnic-Resnik T, Pavlovic M, Kenney EB. A surgical reentry study on the influence of platelet- rich plasma in enhancing the regenerative effects of bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol* 2009; 80: 915-923

9. Cao B, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Cell Cycle* 2004; 3(2): 104-107
10. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641-650
11. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21(3): 429-435
12. Carinci F, Papassio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R, et al. Comparison between genetic portraits of osteoblast derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *J Craniofac Surg* 2008; 19: 616-625
13. Carlisle E, Fischgrund JS. Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine j* 2005;5(6): 240S-249S
14. Charles M, Barr T, et al. Fat embolism following posterior iliac graft harvest for jaw reconstruction: managing the complication of major surgery. *J Can Dent Assoc* 2007; 73(1): 67-70
15. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22:233-241
16. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology* 2000; 24: 9-27
17. Cochran D, King G, Schoolfield J, Velasquez-Plata D, Mellonig J, Jones A. The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol* 2003; 74:1043-1055
18. Cohen RE, Mariotti A, Rethman M, et al. Glossary of periodontal terms. 4th edition. Chicago; The American Academy of Periodontology; 2001

19. Cordeiro MM, Dong Z, Kancko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008; 34: 962-969
20. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explants cultures. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 129-138
21. Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res* 2008; 43(5): 531-536
22. d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 21-26
23. Deasy BM, Gharaibeh BM, et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Bio Cell* 2005; 16(7): 3323-3333
24. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843
25. Dori F, Huszár T, Nikolodakis D, Tihanyi D, Horváth A, Arweiler NB, Gera I, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with beta tricalcium phosphate and expanded polytetrafluoroethylene membranes. *J Periodontol* 2008; 79: 660-669
26. Dori F, Kovács V, Arweiler NB, Huszár T, Gera I, Nikolidakis D, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral: a pilot study. *J Periodontol* 2009; 80:1599-1605

27. Esposito M, Coulthard P, Thomsen P, Worthington HV. Enamel matrix derivative for periodontal tissue regeneration in treatment of intrabony defects: a cochrane systematic review. *Journal of Dental Education* 2004; 68(8): 834-844
28. Fine AS. Bioquímica da cicatrização de feridas. In: STAHL, SS *Cirurgia periodontal: bases biológicas e técnicas*. São Paulo: Panamericana, 1981. p. 60-121
29. Froum S, Weinberg M, Novak J et al. A multicenter study evaluating the sensitization potential of enamel matrix derivative after treatment of two infrabony defects. *J Periodontol* 2004; 75: 1001-1008
30. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Physiol* 2008; 215: 743-749
31. Gay I, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 2007; 10: 149-160
32. Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials* 2004; 25: 1049-1058
33. Giannoudis PV, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7: The UK perspective. *Injury* 2005; 36(3): S47-S50
34. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *PNAS* 2000; 97(25): 13625-13630
35. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22:487-500
36. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology* 2000; 24: 127-152

37. Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 658-668

38. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 1998; 37: 233-249

39. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behaviour of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 2006; 77: 1003-1007

40. Heise, U, Osborn JF, Duwe F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *Int Orthop* 1990; 14: 329-338

41. Heng NHM, N'Guessan PD, Kleber BM, Bernimoulin JP. Enamel matrix derivative induces connective tissue growth factor expression in human osteoblastic cells. *J Periodontol* 2007; 78: 2369-2379

42. Herzog EL, Chai L, et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102(10): 3483-3493

43. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, et al. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004; 10(3-4): 371-380

44. Hirooka H. The biologic concept for the use of enamel matrix protein: True periodontal regeneration. *Quintessence Int* 1998; 29: 621-630

45. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806

46. Inanç B, Elçin AE, Elçin YM. In vitro differentiation and attachment of human embryonic stem cells on periodontal tooth root surfaces. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(11): 3427-35
47. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol* 2001; 72: 314-323
48. Kalpidis C, Ruben M. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol* 2002; 73: 1360-1376
49. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004; 75(9): 1281-1287
50. Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* 2007; 329(2): 283-294
51. Kim SH, Kim KH, Seo BM, Koo KT, Kim TL, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Lee YM. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol* 2009; 80:1815-1823
52. Kinane DF, Chestnutt IG. Critical reviews in oral biology & medicine. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(3): 356-365
53. Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res* 2004; 83(1): 27-34

54. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner C, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD. Optimization of bone-tissue engineering in goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 69:113-120

55. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1394-1402

56. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-926

57. Laurie SW, Kaban LB. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73(6): 933-938

58. Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. Review: Cell therapy for bone regeneration – bench to bedside. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009; 89B:252-263

59. LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontology* 2000; 30: 91-103

60. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998;283: 2-37

61. Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araújo M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 1995; 22: 276-283

62. Lindhe J, Karring T, Lang N. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* 2008. 5ª Ed. Blackwell Munksgaard

63. Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 329-335
64. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 2007; 25(3): 750-760
65. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 2006. 85(11):966-979
66. Marcantonio Jr E, Marcantonio RAC, Cirelli JA. Regeneração óssea: vertical e horizontal. In: *Atualização em periodontia e implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p. 297-320
67. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Matinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2006; 27: 3230-3237
68. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res* 1991; 26:144-154
69. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47(5): 256-260
70. Melcher A, McCulloch C, Cheong T, Nemeth E, Shiga A. Cells from bone synthesize cementum like and bone like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *Journal of Periodontal Research* 1987; 22: 246-247

71. Melloning JT. Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. *Int Periodontics Restorative Dent* 2000; 20(1): 19-29

72. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* May 13, 2003. 100(10): 5807-5812

73. Moscow B. The response of gingival sulcus to instrumentation: A histological investigation. *J Periodontol* 1964; 35: 112-126

74. Muramatsu K, Doi K, et al. Recalcitrant posttraumatic nonunion of the humerus: 23 patients reconstructed with vascularized bone graft. *Acta Orthop Scand* 2003; 74(1): 95-97

75. Murphy KG, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol*, december 2003, vol 8 nr 1, 266-302

76. Murray PE, About I, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Restorative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 482-491

77. Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem Cell Dev* 2004; 13(3): 255-262

78. Muschler GF, Boehm C, et al. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79(11): 1699-1709

79. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395: 66-80

80. Muschler GF, Midura RJ, et al. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. *J Biomed Biotechnol* 2003; 2003(3): 170-193
81. Muschler GF, Nakamoto C, et al. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A(7): 1541-1558
82. Nakahara T. A review of new developments in tissue engineering therapy for periodontitis. *Dent Clin N Am* 2006; 50:265-276
83. Nussenbaum B, Krebsbach PH. The role of gene therapy for craniofacial and dental tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58: 577-591
84. Oda JY, Carvalho J. Periodontal healing:review. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, 8 (2), mai./ago. p.159-172, 2004
85. Offenbacher S. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1:821-878
86. Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work in Lindhe J, Lang M, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 2008 5ª Ed.
87. Papaccio G, Graziano A, D'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *Journal of Cellular Physiology* 2006; 208: 319-325
88. Partridge K, Yang X, Clarke NM, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 144-152

89. Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci* 2009; 1(1): 6-12

90. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(3): 1142-1147

91. Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology* 2000; vol.25, 2001, 37-58

92. Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147

93. Pontoriero R, Nyman S, Ericsson I, Lindhe J. Guided tissue regeneration in surgically produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* 1992; 19: 159-163

94. Radvar M, Mardani N, Mellati E, Habibi M. Improvement of periodontal parameters in untreated quadrants after surgical periodontal therapy at adjacent quadrants. *J Periodontol* 2009; 80: 565-571

95. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am A* 2001; 83(1): S1-S6

96. Research, Science and therapy committee. Position paper: Periodontal regeneration. *J Periodontol* 2005; 76: 1601-1622

97. Reynolds M, Aichelmann-Reidy W, Branch-Mays G. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. Asystematic review. *Ann Periodontol* 2003; 1: 227-265

98. Rimondini L, Mele S. Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol* 2009; 58: 483-499

99. Robertson PB, Buchanan SA. Cicatrização tecidual após terapia periodontal. In: GENCO, RJ, Goldman HM, Cohen W. Periodontia contemporânea. São Paulo: Santos, 1997. p. 382-393

100. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87: 125-128

101. Sculean A, Schwarz F, Miliauskaite A, Kiss A, Arweiler N, Becker J, et al. Treatment of intrabony defects with an enamel matrix protein derivative or bioabsorbable membrane: an 8-year follow-up split-mouth study. *J Periodontol* 2006; 77(11): 1879-1886

102. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364:149-55

103. Silvério KG, Benatti BB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr. FH. Stem cells: Potential Therapeutics for Periodontal Regeneration. *Stem Cell Rev* 2008; 4:13-19

104. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: Potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 2007; 13(2): 151-157

105. Simsek SB, Keles GC, Baris S, Cetinkaya BO. Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clin Oral Invest* 2010

106. Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 1999; 70(9): 1053-1063

107. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69(4): 573-582

108. Takata T. Oral wound healing concepts in periodontology. *Curr. Opin. Periodontol.* 1994; 119-127

109. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A, Caputi S. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. *J Biomed Mater Res* 2008; 87A: 986-993

110. Uchida N, Tsukamoto A, He D, Frieria AM, Scollay R, Weissman IL. High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest* 1998; 101: 961-966

111. Ueno A, Kitase Y, Moriyama K, Inoue H. MC3T3-E1-conditioned médium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol* 2001; 20: 347-353

112. Unda FJ, Martin A, Hilario E, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Arechaga J. Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGFbeta1. *Dev Dyn* 2000; 218: 480-489

113. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899

114. Wakitani S, Imoto K, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(3): 199-206

115. Wakitani S, Mitsuoka T, et al. Autologous bone marrow stromal cell transplantation of repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* 2004; 13(5): 595-600

116. Wakitani S, Nawata M, et al. Repair of articular cartilage defects in the patella-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(1): 74-79
117. Wang HL, Cooke J. Periodontal regeneration techniques for treatment of periodontal diseases. *Dent Clin N Am* 2005; 49: 637-659
118. Wheeler DL, Enneking WF. Allograft bone decreases in strenght in vivo over time. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 435: 36-42
119. Wheeler DL, Haynie JL, et al. Biomechanical evaluation of retrieved massive allografts: preliminary results. *Biomed Sci Instrum* 2001; 37: 251-256
120. Wikesjo UM et al. Periodontal repair in dogs: effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. *J Periodontol* 1991; 62: 180-184
121. Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000; 19: 21-39, 1999
122. Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, Sun YJ, Duan YZ, Lin Z, Jin Y. Apical tooth germ cell-conditioned médium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res* 2009; 44(2): 199-210
123. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res* 2008; 87(8): 767-771

124. Yilmaz S, Kuro B, Altuna-Kirac E. Enamel matrix proteins in the treatment of periodontal sites with horizontal type of bone loss. *J Clin Periodontol* 2003; 30:197-206
125. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res* 2007; 327(2): 301-311
126. Vandeputte KA, Urist MR. Experimental mineralization of collagen sponge and decalcified bone. *Clin Orthop Relat Res* 1965; 40: 48-56
127. Venezia E, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(6): 382-402
128. Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin N Am* 54(2010) 73-92
129. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18:487-496
130. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006; 12: 2813-2823
131. Zhao Q, Gong P, Tan Z, Yang X. Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs): A new possible strategy to promote periodontal regeneration. *Medical Hypotheses* 2008; 70: 944-947
132. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-429